

## 内 容 要 旨 目 次

### 主 論 文

**Serum-inducible protein (IP)-10 is a disease progression-related marker for non-alcoholic fatty liver disease**

(血清 IP-10 値は非アルコール性脂肪性肝疾患の病態進行に関わるマーカーである)

和田 望、高木章乃夫、池田房雄、安中哲也、恩地正浩、能祖一裕、中司敦子、和田 淳  
小池和子、宮原孝治、白羽英則、山本和秀、岡田裕之

**Hepatology International 11(1): 115-124, 2017**

平成 28 年 4 月 第 102 回 日本消化器病学会総会に発表

## 主論文

### Serum-inducible protein (IP)-10 is a disease progression-related marker for non-alcoholic fatty liver disease

(血清 IP-10 値は非アルコール性脂肪性肝炎の病態進行に関わるマーカーである)

#### 【緒言】

非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) は肥満に関係し近年増加傾向にある慢性肝疾患である。NAFLD 患者の多くは非進行性の非アルコール性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver; NAFL) であるが、一部の患者は肝硬変進展や肝細胞癌発症が問題となる非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis; NASH) へ進行してしまう。NAFL および NASH の鑑別のためには肝生検が必要であり、両者を非侵襲的に鑑別するための有用なバイオマーカーは現時点では確立されていない。

NAFL から NASH への進行については肥満・糖尿病やインスリン抵抗性・酸化ストレスなど様々な要因が関与しているといわれているが、不明の部分も多い。NAFLD は生活習慣に根差した肥満・血糖上昇に関連した一連の疾患群であり、広義のメタボリック症候群に含めることもできる。脂肪組織由来のサイトカインがメタボリック症候群の進行を促進するという報告や、肥満患者において脂肪組織や肝臓に炎症誘発性の M1 マクロファージが多数認められるとの報告もあり、肥満による炎症が病態に大きく影響していることは明らかである。NAFL においても肝へのマクロファージ浸潤が増加し、マクロファージ誘発に関与するケモカインである CCL2 の発現が亢進することが報告されている。更に、NASH では CD4 および CD8 陽性 T 細胞の浸潤が増加し、IL-6 や IL-8 などの炎症性サイトカインが上昇していると報告されている。

今回我々は、NAFLD 患者血清中のサイトカインを測定し、NAFL と NASH の鑑別に有用なマーカーを探索した。また、臨床上 NAFL と比べ NASH においてインスリン抵抗性が強く血小板低下を認めたことから、この病態を *in vitro* で再現し、NAFL と NASH のサイトカイン産生の相違がどのような機序で生じているか、につき基礎的な検討を行った。

#### 【対象と方法】

2005 年 9 月から 2013 年 4 月の間に当院で肝生検により診断した NAFLD 患者から B 型肝炎・C 型肝炎・自己抗体陽性の患者を除外した NAFL 患者 20 例と NASH 患者 59 例を対象とした。比較対象として 20 例の健常者を加えた計 99 例の血清で Bio-Plex Pro ヒトサイトカインアッセイパネルを用いて 27 種類の炎症・免疫応答関連サイトカインを測定した。また、健常者・NAFL・NASH と段階的に上昇を認めたサイトカインについて ROC 曲線を作成し、従来 NAFL と NASH の診断マーカーとして提唱されていた Fib-4 index や APRI・CK18 などと比較を行った。次に、測定したサイトカインの一部については肝組織中の発現

を確認するため、生検組織より抽出した mRNA を用いて real-time PCR 法によりサイトカインの mRNA を定量した。また、健常者・NAFL・NASH で段階的に上昇を認めた IP-10 について、生検組織を用いて免疫染色を施行し、門脈域内 3 か所の陽性細胞数を半定量的に測定した。

また、IP-10 産生の機序について基礎的な検討を行った。IP-10 が単球系細胞より産生されることが一般的であるという既報より、CD14 陽性ヒト単球細胞株 (THP-1) を利用した *in vitro* 実験を行った。THP-1 細胞培養液中に高濃度のグルコース (5.5g/L) と低濃度のグルコース (2g/L) をそれぞれ添加した。さらにインスリンと TLR2 ligand を加えた群と加えなかった群とに分けて、サイトカインの mRNA 発現を real-time PCR 法で測定した。

#### 【結果】

NASH 患者は NAFL 患者と比較して血小板数が低値であり ( $p=0.01$ )、PT-INR が延長 ( $p<0.01$ )、AST が高値であった ( $p<0.01$ )。また、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR が高値であった ( $p<0.01$ )。27 種類の測定したサイトカインの内 16 種類では健常者・NAFL・NASH の間で有意な差はみられなかった。PDGF-BB・IL-17・IL-5 の 3 種類のサイトカインは健常者と比較して NASH 患者において有意に低値であった。IL-1 $\beta$ ・IL-6・IL-8・MIP-1 $\alpha$ ・MIP-1 $\beta$  の 5 種類のサイトカインは健常者と比較して NAFL・NASH で有意に上昇していたが、NAFL と NASH の間に有意差はみられなかった。また、MCP-1・IL-15・IP-10 の 3 種類のサイトカインは健常者と比較して NASH 患者で有意に上昇しており、その中で唯一 IP-10 は健常者から NAFL・NASH へと進行するに従い段階的に有意な上昇を認めていた。IP-10 を用いて ROC 曲線を作成したところ、全症例での NAFLD の診断では AUROC 0.91、全症例中の NASH の診断では AUROC 0.83、NAFLD 患者中での NASH の診断では AUROC 0.72 と良好な結果であった。また、従来診断マーカーと比較したところ Fib-4 index や APRI といった肝線維化を反映しやすいマーカーと比較すると特異度は低いが高感度が高いという結果であった。肝細胞変性を反映するとされている CK18 の NAFLD 患者中 NASH 診断では AUROC 0.62 であったのに対して IP-10 は 0.72 であった。ROC 曲線から設定した IP-10 の cut off 値は 700pg/ml で、IP-10 が 700pg/ml 以上の症例と未満の症例について臨床 data との関連を解析したところ、IP-10 高値は血小板数低値 ( $p=0.04$ ) と AST 高値 ( $p=0.01$ ) に相関していた。

肝生検組織中での mRNA 発現については MCP-1 と IP-10 が NAFL と比較して NASH において有意に発現亢進していた。IP-10 の肝生検組織中の免疫染色については、門脈域内の IP-10 陽性細胞が 3 個以上であった症例が、NAFL と比較して NASH で有意に多い結果であった。

培養細胞を用いた検討は、臨床データ上 NAFL と NASH の違いとして明らかになったインスリン抵抗性と血小板低下状態がサイトカイン産生にどのように関係しているか、を明らかにすることを目的として、条件設定を行った。すなわち、インスリン抵抗性状態は高グルコース+高インスリンで再現した。血小板低下は門脈圧亢進状態を反映し、腸管の腸内細

菌バリア破綻に伴う腸内細菌刺激が肝臓にかかるようになるため、細菌関連刺激として TLR を培養系に加えて再現した。これらの条件により、サイトカイン産生能がどのように変化するか、の検討を行った。NAFL と NASH で有意差を認めなかった MIP-1 $\alpha$  はスタンダード（低グルコース-インスリン非添加-TLR2 ligand 非添加）群と比較して高グルコース-インスリン添加群において産生が亢進した。一方、IP-10 は高グルコース-インスリン添加だけでは産生亢進を認めず、TLR2 ligand を更に添加した群においてのみ産生が亢進していた。MIP-1 $\alpha$  はインスリン抵抗性のみで産生が亢進するが、IP-10 はインスリン抵抗性に加えて細菌関連刺激が入ることで産生亢進すると考えられた。

#### 【考察】

今回の検討では NAFLD 症例においていくつかのサイトカイン上昇を認めたが、その中で唯一 IP-10 が健常者から NAFL、更に NASH へと進行するに従って段階的に上昇していた。IP-10 は NAFLD・NASH 診断において特異度は低いが高感度が高く、肝生検が必要かどうかを検討するためのスクリーニングにおいて良いマーカーとなると考えられた。また、NAFL と NASH で有意差を認めなかった MIP-1 $\alpha$  は、*in vitro* の検討でもインスリン抵抗性条件だけで産生亢進したのに対して、IP-10 はインスリン抵抗性状態のみでは産生亢進せず、インスリン抵抗性にさらに細菌関連刺激の影響を受けた場合でのみ産生亢進した。よって、NAFL から NASH への進展には、インスリン抵抗性・腸内細菌叢の両者が関与していると考えられ、両者の改善が NASH 進展対策につながる可能性がある。

#### 【結論】

IP-10 は NAFL と NASH の鑑別において有用なバイオマーカーであった。また、インスリン抵抗性が高い状態で腸内細菌の影響を受けることにより IP-10 産生が亢進し NASH へ進行する可能性が示唆された。